

Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego o wysokiej zawartości kwasów omega-3

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego o wysokiej zawartości kwasów z szeregu omega-3, w tym w szczególności kwasu eikozapentaenowego (EPA) oraz dokozaheksaenowego (DHA), przy jednoczesnym zagospodarowaniu oleju odpadowego po wędzeniu ryb.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, zwłaszcza kwas eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), należą do grupy cennych związków chemicznych, często występujących w suplementach diety oraz żywności funkcjonalnej. Kwasy EPA i DHA naturalnie występują w algach oraz olejach ryb, takich jak łosoś, dorsz czy śledź, wywierają pozytywny wpływ w rozwoju układu nerwowego oraz układu narządu wzroku. Spożywanie DHA i EPA obniża ryzyko wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego oraz obniża poziom cholesterolu we krwi.

Spożywanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WKT) zawartych w rybach, bezkręgowcach morskich i przetworach z organizmów morskich jest podstawowym źródłem tych związków w diecie człowieka i niesie wiele korzyści zdrowotnych, jednak konsumpcja mięsa rybnego oraz tłuszczów rybnych może także nieść ryzyko spożycia toksycznych ksenobiotyków np. metali ciężkich, polichlorowanych bifenyli (PCB), pozostałości pestycydów chloroorganicznych czy polichloropochodnych dioksyn (PCDD) i furanów (PCDF) (Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. vol. 114(1), (2018), s. 5-16). Alternatywnym źródłem WKT może być olej mikrobiologiczny.

Olejem mikrobiologicznym nazywane są zapasowe substancje lipidowe syntetyzowane przez mikroorganizmy olejogenne, zdolne do gromadzenia w ciałkach lipidowych tłuszczów w ilości powyżej 20% suchej masy. Na podstawie danych literaturowych, tj. *Progress in Lipid Research* 52, (2013), s. 395-408 wiadome jest, że do organizmów zdolnych do syntezy oleju mikrobiologicznego zalicza się różne gatunki bakterii, grzybów strzępkowych, mikroalg i drożdży.

Największe nadzieje w syntezie tłuszczu wewnątrzkomórkowego wiąże się z drożdżami z gatunku *Yarrowia lipolytica*, ze względu na ich unikalne cechy oraz istniejące narzędzia inżynierii genetycznej do modyfikacji tych drożdży. Ponadto z patentów PL 216012 B1 i PL 215829 B1 wiadome jest, że drożdże *Y. lipolytica* syntetyzują kwasy organiczne oraz enzymy, a ich biomasa stanowi cenne źródło białka paszowego.

W patencie US8323935B2 i publikacji *Aquaculture*, (2012), s. 39-47 przedstawiono genetycznie modyfikowane szczepy drożdży *Y. lipolytica* zdolne do syntezy oleju mikrobiologicznego o wysokiej zawartości kwasu eikozapentaenowego (EPA). Dzikie szczepy tego gatunku nie potrafią syntezować kwasu EPA czy DHA, a jedynie pobierać ze środowiska, włączając w cząsteczki triacylogliceroli kumulowane w komórce (J. Biosci. Bioeng. vol. 87(2), (1999), s. 184-188).

Y. lipolytica stanowi gatunek, który jest zdolny do efektywnego wykorzystania substratów odpadowych o charakterze lipidowym m.in. odpadowej wody po tłoczeniu oliwy (ang. olive mill wastewater - OMW) oraz ścieków po produkcji oleju palmowego (ang. palm oil mill effluents - POME). Szczepy *Y. lipolytica* znalazły także zastosowanie w laboratoryjnej utylizacji takich lipidowych odpadów jak łój, czy roślinne odpady rafineryjne. Jednocześnie w kilku przypadkach obserwowano syntezę m.in. enzymów lipolitycznych, tłuszczu wewnątrzkomórkowego (SCO – ang. single cell oil), biomasy (SCP – single cell protein) czy kwasu cytrynowego (Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(5), (2009), s. 847-865; J. Environ. Sci. 21, (2009), s. 237-242). W artykułach w czasopiśmie *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* vol. 2, (2014), s. 28-33 i *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 588, (2017), s. 15-24 przedstawiono sposób zagospodarowania odpadów przemysłu spożywczego i paliwowego w hodowli wgłębnej drożdży *Y. lipolytica* KKP 379 z równoczesną syntezą enzymów lipolitycznych.

Obecnie tłuszcze pochodzenia mikrobiologicznego nie są szeroko wykorzystywane komercyjnie. Jednak w nieodległej przyszłości łatwość zwiększania skali produkcji, a także krótki czas generacji mikroorganizmów oraz niezależność ich wzrostu od warunków klimatu i pór roku może zdecydować o ich powszechnym wykorzystaniu. Ponadto skład oleju wytwarzanego metodami mikrobiologicznymi można różnorodnie modyfikować, w tym wzbogacać o określone kwasy tłuszczowe. Na podstawie artykułu *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, (2011), s. 1031-1051 wiadomo, że w celu zwiększonej produkcji i kumulacji tłuszczu wewnątrz komórki powinno się dobrać odpowiedni stosunek węgla do azotu (C:N) oraz stężenie mikro- i makroelementów. Dodatkowo ważny jest również właściwy dobór źródła węgla do podłoża hodowlanego.

Sposób wytwarzania oleju mikrobiologicznego z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* według wynalazku charakteryzuje się tym, że prowadzi się hodowlę okresową drożdży w podłożu półsyntetycznym, zawierającym od 2,0 do 7,5 g/dm³ źródła azotu w postaci (NH₄)₂SO₄, Tween 80 w ilości nie mniej niż 0,5 g/dm³ i nie więcej niż 2 g/dm³, ekstrakt drożdżowy w ilości nie mniej niż 0,5 g/dm³ i nie więcej niż 2 g/dm³, pepton w ilości nie mniej niż 0,5 g/dm³ i nie

więcej niż 2 g/dm³ oraz sole mineralne wybrane spośród: KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄, ZnSO₄, MnCl₂ x 4H₂O, przy zastosowaniu nie więcej niż 0,025% v/v hodowli inokulacyjnej charakteryzującej się liczebnością komórek drożdży wynoszącą od 8,0 do 8,5 log j.t.k./cm³, przy czym do podłoża dodaje się od 1 do 10% w/v oleju odpadowego po procesie wędzenia ryb, zaś pH podłoża wynosi między 5 a 7, a temperatura hodowli od 24 do 30°C.

Korzystnie hodowlę inokulacyjną drożdży *Y. lipolytica* prowadzi się w podłożu zawierającym w 1 dm³: 20g glukozy, 20 g peptonu i 10g ekstraktu drożdżowego, w czasie 24 godzin.

Korzystnie udział soli mineralnych wynosi: KH₂PO₄ od 6 do 8 g/dm³, Na₂HPO₄ od 2 do 5 g/dm³, MgSO₄ od 1 do 3 g/dm³, CaCl₂ od 0,1 do 0,2 g/dm³, FeSO₄ od 0,1 do 0,2 g/dm³, ZnSO₄ od 0,01 do 0,03 g/dm³, MnCl₂ x 4H₂O od 0,05 do 0,10 g/dm³.

Biomasę drożdży oddziela się od płynu pochodowlanego, przemywa się roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia pozostałości oleju z podłoża hodowlanego. Następnie otrzymaną biomasę poddaje się procesowi suszenia do osiągnięcia suchej masy i ekstrahuje się olej. Po ekstrakcji rozpuszczalnik jest odparowywany, a otrzymany olej poddawany jest hydrolizie. Kwasy tłuszczowe poddaje się derywatywacji do postaci estrów metylowych.

Tak zsyntezowany olej mikrobiologiczny zawiera w swoim składzie nie mniej niż 6% kwasu eikozapentaenowy (EPA, C20:5) oraz nie mniej niż 7% kwasu dokozaheksaenowego (DHA, C22:6) w odniesieniu do sumy wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w oleju wyekstrahowanym z komórek drożdży

W sposobie według wynalazku do wytwarzania oleju mikrobiologicznego zastosowano jako źródło węgla odpadowy olej po procesie wędzenia ryb, który zapewnił optymalny stosunek węgla do azotu, a także dobrano właściwy zestaw i stężenie mikro- i makroelementów. Uzyskano wysoką produktywność lipidów wewnątrzkomórkowych i wysoką kumulację kwasów EPA i DHA. Olej mikrobiologiczny produkowany jest przez komórki dzikich niemodyfikowanych szczepów drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* w ilości co najmniej 10% suchej biomasy w hodowli okresowej.

Sposób według wynalazku jest jedną z metod utylizacji hydrofobowych substancji odpadowych przy jednoczesnej waloryzacji tych odpadów do tłuszczu wewnątrzkomórkowego, który może znaleźć zastosowanie jako suplement diety oraz dodatek paszowy. Wykorzystanie odpadowego źródła węgla w postaci odpadowego oleju po procesie wędzenia ryb przyczynia się do obniżenia kosztów produkcji tłuszczu wewnątrzkomórkowego, a wykorzystanie wynalazku jest ważne w wymiarze gospodarczym i społecznym oraz wpisuje się w politykę zrównoważonego rozwoju.

Niniejszy wynalazek zostanie zilustrowany z pomocą podanych niżej przykładów.

Przykład 1.

Sposób produkcji biomasy drożdży bogatej w olej mikrobiologiczny.

Podłoże półsyntetyczne zawiera w swoim składzie: olejowy odpad po procesie wędzenia ryb w ilości 50 g/dm^3 , Tween 80 1 g/dm^3 , ekstrakt drożdżowy 2 g/dm^3 , pepton 1 g/dm^3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2,5 \text{ g/dm}^3$, KH_2PO_4 7 g/dm^3 , Na_2HPO_4 $2,5 \text{ g/dm}^3$, MgSO_4 $1,5 \text{ g/dm}^3$, CaCl_2 $0,15 \text{ g/dm}^3$, $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ $0,16 \text{ g/dm}^3$, ZnSO_4 $0,02 \text{ g/dm}^3$ i $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ $0,08 \text{ g/dm}^3$. Hodowle okresowe prowadzi się w bioreaktorze laboratoryjnym o objętości roboczej podłoża wynoszącej 4 dm^3 w temperaturze $28 \text{ }^\circ\text{C}$ przy obrotach mieszadła promieniowego z 6 łopatkami 350 rpm i stałym natlenianiu sprężonym powietrzem (szybkość napowietrzania $1,75 \text{ dm}^3/\text{min}/\text{dm}^3$ podłoża). Podłoże półsyntetyczne jest zaszczipiane 1 cm^3 24-godzinnej hodowli inokulacyjnej prowadzonej w podłożu YPG o mianie $8,29 \text{ log j.t.k./cm}^3$. W fazie stacjonarnej wzrostu biomasa jest oddzielana od płynu pohodowlanego w wirówce szybkoobrotowej. Parametry 67-godzinnej hodowli opisanej w przykładzie przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry kinetyczne charakteryzujące biosyntezę oleju mikrobiologicznego w hodowlach w bioreaktorze przez drożdże *Y. lipolytica* KKP 379, gdzie: t - czas hodowli, S - początkowe stężenie substratu, X - plon suchej biomasy drożdży, $Y_{X/S}$ - wydajność produkcji biomasy z substratu, $Y_{L/X}$ - wydajność kumulacji lipidów w odniesieniu do plonu suchej biomasy, L - objętościowa produktywność, $Y_{L/S}$ - wydajność kumulacji lipidów w odniesieniu do substratu, Q_L - średnia szybkość objętościowa kumulacji lipidów, q_L - średnia szybkość właściwa kumulacji lipidów.

Parametr	Jednostka	Wartość parametru
t	[h]	67
S	$[\text{g dm}^{-3}]$	50
X	$[\text{g dm}^{-3}]$	11,7
$Y_{X/S}$	$[\text{g g}^{-1}]$	0,234
$Y_{L/X}$	$[\text{g g}^{-1}]$	0,187
L	$[\text{g dm}^{-3}]$	2,188
$Y_{L/S}$	$[\text{g g}^{-1}]$	0,044
Q_L	$[\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}]$	0,033
q_L	$[\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	0,003

Na podstawie plonu biomasy drożdży oraz oznaczeń zawartości tłuszczu w komórkach obliczono parametry charakteryzujące syntezę tłuszczu wewnątrzkomórkowego w hodowlach

w bioreaktorze przez drożdże *Y. lipolytica* (Tabela 1). Objętościowa produktywność biosyntezy oleju mikrobiologicznego oraz średnia szybkość objętościowa kumulacji lipidów są równie ważnym czynnikiem decydującym o potencjalnym wykorzystaniu danego mikroorganizmu do produkcji tłuszczu na skalę przemysłową. Objętościowa produktywność syntezy oleju w podłożu doświadczalnym (z odpadowym olejem rybim) wynosiła 2,2 g oleju dm⁻³ podłoża hodowlanego. Średnia szybkość objętościowa kumulacji lipidów wynosiła 0,033 g dm⁻³ h⁻¹.

Przykład 2.

Ekstrakcja oleju mikrobiologicznego z namnożonej biomasy i analiza składu kwasów tłuszczowych

Biomasę drożdży otrzymaną według sposobu opisanego w przykładzie 1 oddziela się od płynu pohodowlanego poprzez wirowanie w wirówce szybkoobrotowej. Biomasa przemywa się roztworem soli fizjologicznej w objętości równej płynowi pohodowlanemu, w celu usunięcia pozostałości oleju z podłoża hodowlanego i ponownie wiruje. Tak otrzymaną biomasa poddaje się procesowi suszenia w temperaturze 80 °C do osiągnięcia suchej masy, a następnie biomasa drożdży rozciera z piaskiem i umieszcza w bibułowej gilzie. Olej ekstrahuje się heksanem w ilości 150 cm³ heksanu na 40 g mokrej biomasy drożdży metodą ługowania w aparacie Soxhleta przez 2 godziny. Po ekstrakcji rozpuszczalnik odparowywany jest w wyparce próżniowej, a otrzymany olej poddawany jest hydrolizie. Kwasy tłuszczowe poddaje się derywatywacji do postaci estrów metylowych przy użyciu 1 M metanolanu sodu oraz 10% BF₃. Skład kwasów tłuszczowych oznacza się, wykorzystując metody chromatografii gazowej z zastosowaniem kolumny kapilarnej i detektora płomieniowo-jonizacyjnego GC-FID. Przykładowe wyniki analizy w odniesieniu do biomasy namnożonej wg przykładu I przedstawiono w tabeli 2.

Zawartość lipidów w komórkach hodowanych w podłożu z 5% olejem rybim wg przykładu I wyniosła 0,187 g oleju g⁻¹ s. m. drożdży (18,7% suchej biomasy drożdży).

Tabela 2. Skład kwasów tłuszczowych zawartych w substracie (odpadowy olej po procesie wędzenia ryb) oraz oleju mikrobiologicznym ekstrahowanym z komórek drożdży namnożonych w podłożu z odpadowym olejem rybim [zawartość procentowa w stosunku do zawartości wszystkich kwasów tłuszczowych, %].

Symbol	Kwas tłuszczowy		Odpadowy olej po procesie wędzenia ryb	Olej mikrobiologiczny z komórek drożdży <i>Y. lipolytica</i> hodowanych w podłożu z odpadowym olejem rybim
	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa		

C14:0	tetradekanowy	mirystynowy	8,1	2,8
C16:0	heksadekanowy	palmitynowy	12,1	9,0
C16:1	heksadecenowy	palmitooleinowy	11,5	3,5
C18:0	oktadekanowy	stearynowy	3,2	1,5
C18:1	oktadecenowy	oleinowy	17,3	29,5
C18:2	oktadekadienowy	linolowy	1,4	6,1
C18:3	oktadekatrienowy	linolenowy	4,6	1,5
C20:0	eikozanowy	arachidowy	-	2,8
C20:1	eikozenowy	-	10,0	5,2
C22:0	dokozanowy	behenowy	-	2,8
C22:1	dokozenowy	erukowy	11,2	2,1
C24:0	tetrakozanowy	lignocerynowy	-	11,3
C24:1	tetrakozenowy	nerwonowy	-	1,8
C20:5	Eikozapenta- enowy (EPA)	-	8,0	7,3
C22:6	Dokozaheksa- enowy (DHA)	-	10,6	10,0
Pozostale			2,0	2,8
MUFA			50,0	42,2
PUFA			24,6	24,8